雷公藤提取物中主要物质基础及其抗肿瘤活性研究

胡丹[1,2,3]，丁同同[1,2,3]，李江[1,2]，邓璐璐[1,2]，吴树燕[2]，穆淑珍[1,2*]

（1.贵州医科大学 省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室，贵阳 550014；2. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室，贵阳 550014；3. 贵州医科大学药学院，贵阳 550025）[1]

摘 要：为了进一步阐明雷公藤中的主要物质基础，评价其抗肿瘤活性，该文采用了柱层析、HPLC 等多种分离材料和技术从雷公藤 95%乙醇提取物中分离得到 12 个化合物，并根据理化性质及波谱数据鉴定了各化合物的结构为α,β-amyrenone (**1**)、3β-acetoxyolean-12-en-28-oic acid (**2**)、antriptolactone (**3**)、ω-hydroxypropioquaiacone (**4**)、3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-propenal (**5**)、3-methoxy-4-hydroxy phenylethanol (**6**)、vanillin (**7**)、3, 4, 5-三甲氧基苯酚 (**8**)、对羟基苯甲酸 (**9**)、对羟基苯甲醛 (**10**)、vanillyl alcohol (**11**)、2, 6-dimethxy-1, 4-benzoquinone (**12**)。其中化合物 **1**，**2**，**5** 和 **12** 为首次在该属植物中分离得到。采用 MTT 法对 12 个化合物进行了抗 SH-SY5Y 细胞株，K562 细胞株和 Hel 细胞株等 3 种肿瘤细胞系细胞增殖活性的筛选，并对活性较好的化合物 **12** 进行 Hoechst 荧光染色和促凋亡作用的检测。结果发现化合物 **2**，**3**，**5** 和 **12** 具有一定的抗肿瘤活性，其中化合物**12** 的抗肿瘤活性最为显著（SH-SY5Y 细胞、Hel 细胞、K562 细胞的 IC_{50} 分别为 35.6、14.3、28.8 μmol·L^{-1}）。该研究进一步丰富了雷公藤的化学成分，且发现了一个具有明显抗肿瘤活性的单体物质，为雷公藤的进一步开发提供了科学依据。

关键词：雷公藤，物质基础，分离纯化，结构鉴定，抗肿瘤活性

中图分类号：R284.1/R284.2　　　　　　**文献标识码：**A

Main material basis and anti-tumor activities of *Tripterygium wilfordii* extract

HU Dan[1,2,3], DING Tongtong[1,2,3], LI Jiang[1,2], DENG Lulu[1,2], WU Shuyan[2], MU Shuzhen[1,2*]

(1. *State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants*, *Guizhou Medical University*, Guiyang 550014, China; 2. *Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of*

收稿日期：2020-12-23

基金项目：贵州省科技计划项目(黔科合基础-ZK[2021]一般 516)；贵阳市科技计划项目（[20151001]药 14 号）[Supported by Guizhou Province Science and Technology Plan Project(QKH-ZK[2021] General 516; Guiyang Science and Technology Plan Project ([20151001] Medicine No. 14)]。

作者简介：胡丹（1996-），硕士研究生，主要从事天然药物化学研究，（E-mail）1041163584@qq.com。

*__通讯作者：__穆淑珍，博士，研究员，从事天然产物化学研究，（E-mail） muzi0558@126.com。

Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550014, China; 3. *School of Pharmaceutical Sciences*, *Guizhou Medical University*, Guiyang 550025, China)

ABSTRCT: In order to clarify the main material basis of *Tripterygium wilfordii* and evaluate its anti-tumor activity. In this experiment, twelve compounds were isolated from the extract of *Tripterygium wilfordii*, by using column chromatography, HPLC and other separation materials and techniques. And according to the physicochemical properties and spectral data, the structures of the compounds were identified as: α,β-amyrenone (**1**), 3β-acetoxyolean-12-en-28-oic acid (**2**), antriptolactone (**3**), ω-hydroxypropioquaiacone (**4**), 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-propenal (**5**), 3-methoxy-4-hydroxy phenylethanol (**6**), vanillin (**7**), 3, 4, 5-trimethoxyphenol (**8**), p-hydroxybenzoic acid (**9**), p-hydroxybenzaldehyde (**10**), vanillyl alcohol (**11**) and 2, 6-dimethxy-1, 4-benzoquinone (**12**). Compounds **1**, **2**, **5** and **12** were isolated from this plant for the first time. In terms of biological activity, their anti-tumor activities *in vitro* were screened for the SH-SY5Y cell line, K562 cell line and Hel cell line by MTT method, and the compound **12** with better activity was subjected to Hoechst fluorescent staining to detect its pro-apoptotic effect. The results showed that compounds **2**, **3**, **5** and **12** had certain anti-tumor activity, of which compound **12** has the most significant anti-tumor activity (IC_{50} of SH-SY5Y，Hel，K562 were 35.6，14.3，28.8 μmol·L^{-1}). This study further enriched the chemical components of *Tripterygium wilfordii*, and discovered a monomer substance with obvious anti-tumor activity, which provided a scientific basis for the further development of *Tripterygium wilfordii*.

Key words: *Tripterygium wilfordii*, material basis, separation and purification, structure identification, anti-tumor activity

雷公藤（*Tripterygium wilfordii*）是卫矛科（Celastraceae）雷公藤属（*Tripterygium*）植物，又名莽草、黄藤木、断肠草等，主要分布于长江中下游地区，西南地区以及韩国日本等地（利剑余，2017）。雷公藤以根、叶、花及果入药，其味辛、苦，性寒，有大毒，具有祛风除湿，消肿止痛，杀虫解毒等功效（马哲等，2011），主要用于治疗类风湿性关节炎，肾小球肾炎红斑狼疮等自身免疫性疾病及各种皮肤病（刘为萍等，2010）。

国内外众多学者对雷公藤植物的根、叶及果实等部分进行了化学成分的研究。迄今为止从雷公藤中分离得到的单体化合物有 200 多种，主要化学成分包括倍半萜、二萜、三萜、木质素、生物碱类、黄酮类等（马伟光等，2006）。其中二萜，三萜，生物碱类化合物是其主要活性成分。在药理及临床研究方面，雷公藤具有抗炎，免疫抑制，抗肿瘤，抗菌，抑制生育等生物活性（Chou & Mei，1936）。近些年，随着生命科学和分子生物学的飞速发展，有些新的发现使雷公藤物质基础的研究备受关注。雷公藤红素被发现能降低小鼠 45%的体重，并可能对 2 型糖尿病、脂肪肝等疾病有治疗效果（Liu et al.，2015）；雷公藤内酯酮也被研究发现是一种极具转化应用前景的非激素类男性避孕候选药（Chang et al.，2021）。雷公藤的临床疗效显著，但其临床研究报道雷公藤也具有一定的生理毒性，通常在几小时内脏器会发生严重的功能障碍以及严重的器质性损害，对肝、肾的毒性最为明显，有时甚至会导致死亡（利剑余，2017）。经研究发现产生毒性反应的成分是其主要

活性成分二萜类。二萜是雷公藤中目前研究的较多的化学成分，而对于雷公藤中其他成分的研究较少，其广泛的生物活性依然有待继续挖据。鉴于雷公藤高效的生物活性，且为提高雷公藤临床上的利用度，探究雷公藤中主要物质基础及其其他成分的生物活性显得尤为重要。

由此我们对雷公藤提取物进行了化学成分的分离与鉴定，并对得到的化合物进行了抗肿瘤及抗白血病的活性筛选。本研究从雷公藤提取物中分离出 12 个单体化合物，结构类型涉及萜类，酚酸类和醌类。且在体外活性筛选方面，首次发现雷公藤提取物中醌类化合物（化合物 **12**）具有明显的抗神经母瘤细胞增殖活性。

图 1 化合物 **1-12** 结构式

Fig. 1 The structure of compounds **1-12**

1 材料与仪器

1.1 材料

雷公藤药材购自贵阳市花果园药材中药市场，经贵州中医药大学董丽莎教授鉴定为雷公藤（*Tripterygium wilfordii*）的根部。

1.2 试剂与耗材

SH-SY5Y 细胞株，K562 细胞株，Hel 细胞株（上海奥陆生物科技有限公司）；甲氨蝶呤水合物（Enetgy Chemical，批号：DJ210110）；细胞凋亡荧光 Hoechst 33342/PI 双染试剂盒（Solarbio Life Sciecnces，批号：CA1120）；双抗（青霉素+链霉素，HyClone，批

号：J140032）；DMEM 培养基，RPMI1640 培养基，胎牛血清（Gibco 公司）；甲醇，乙醇，氯仿，乙酸乙酯，石油醚（国药集团化学试剂有限公司）。Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶（40 ~ 70 μm, 瑞士 Amersham Pharmacia Biotech AB 公司）；柱层析硅胶（200 ~ 300 目和 300 ~ 400 目），硅胶 H （10 ~ 40 μm）和薄层层析硅胶 GF254（0.20 ~ 0.25 mm）（青岛海洋化工厂）。

1.3 仪器

Sim-HPLC 半制备色谱仪（Wasters, Delta 600）；酶标仪（Therm scientific, VARIOSKANLUX）；显微镜（Leica, Dmi8）；流式细胞仪（ACEABIO, Novocyte）；Sim-HPLC 半制备色谱仪（Wasters, Delta 600） ESI-MS 电喷雾质谱仪（布鲁克道尔顿公）司；600 MHz 型超导核磁共振仪（瑞士 Bruker 公司）。

2 方法

2.1 提取分离

雷公藤药材 20 kg，95%乙醇回流提取 3 次，每次 3 h。收集提取液浓缩至原体积的 1/3，少量多次加水，浓缩至无醇味。乙酸乙酯萃取至无颜色，浓缩旋干萃取液，取适量溶剂溶解，中性氧化铝拌样，洗脱剂为乙酸乙酯过中性氧化铝层析柱（100~200 目），浓缩回收溶剂得到雷公藤多苷粗品 104 g。

雷公藤多苷粗品用 40~80 目硅胶拌样，使其均匀吸附于硅胶上，10 倍量的硅胶柱层析（200~300 目）粗分段，以不同体积比的氯仿:甲醇（70:1~1:1）进行梯度洗脱。通过薄层层析（TLC）跟踪观察组分在紫外分析仪下的荧光及显色情况，合并相似部分，共分为 6 段，标记为 Fr.1（400 mg）、Fr.2（2.5 g）、Fr.3（40 g）、 Fr.4（20 g）、Fr.5（40 g）和 Fr.6（4.1 g）。将 Fr.5 段先通过 MCI 柱，洗脱剂为不同体积比的甲醇:水混合溶剂进行梯度洗脱，洗脱比例为 50:1、70:1、90:10、100:0。TLC 跟踪观察组分在紫外分析仪下的荧光及显色情况，合并相似部分，标记为 Fr.5.1（200 mg）、Fr.5.2（1.5 g）、Fr.5.3（12.9 g）、Fr.5.4（21.7 g）。Fr.5.1 段经葡聚糖凝胶柱层析及反复重结晶得到化合物 **12**（8 mg）。Fr.5.4 经半制备分离技术得到化合物 **7**（8 mg）、**8**（6 mg）、**9**（12 mg）、**10**（9 mg）和 **11**（15 mg）。Fr.1 经反复重结晶、正反相硅胶柱层析得到化合物 **3**（88 mg）。Fr.2 经 MCI 柱层析、葡聚糖凝胶柱层析及半制备高效液相色谱等分离手段得到化合物 **1**（32 mg）、**2**（25 mg）。Fr.4 经葡聚糖凝胶粗分段后过半制备得到化合物 **4**（9 mg）、**5**（15 mg）和 **6**（12 mg）。

2.2 生物活性测试

2.2.1 MTT 法筛选化合物活性

收集对数生长期的 SH-SY5Y 细胞、K562 细胞、Hel 细胞，重悬得到细胞悬液并进行细胞计数，按照每孔 90 μL 的体积将细胞接种于 96 孔板中，在 5% CO_2，37 ℃条件下的细胞培养箱中培养过夜待其细胞贴壁后，加入 10 μL 含药培养基，使得药物终浓度为 100，50，20，10，5，2.5 $\mu mol \cdot L^{-1}$，每个浓度 3 个复孔。于 5% CO_2，37 ℃细胞培养箱中培养 48 h。每孔加入 10 μL 浓度为 5 $mg \cdot mL^{-1}$ 的 MTT 溶液，放置在培养箱中继续培养 4 h。弃掉上清液，每孔加入 DMSO 160 μL，震荡 15 min 使得甲臜紫色结晶完全溶解。将 96 孔板按

要求放置于酶标仪中，选择波长为 490 nm，在此条件下测定吸光度 OD 值。根据测得的 OD 值计算细胞抑制率。

抑制率（%）= [OD（空白组）—OD（给药组）]/ OD（空白组）×100

2.2.2 Hoechst 染色

收集对数生长期 SH-SY5Y 细胞、K562 细胞、Hel 细胞，重悬得到细胞悬液并进行细胞计数，均匀铺于六孔板中，在 5% CO_2，37 ℃条件下的细胞培养箱中培养待其贴壁，细胞密度长至 70%~80%时加入不同浓度的药物(终浓度为 10、20、50 μmol·L^{-1})，继续培养 24 h，弃去培养液，加入 0.8 mL 细胞染色缓冲液，加入 5 μL Hoechst 染色液，加入 5 μL PI 染色液，混匀，4 ℃孵育 25 min，弃去染色液，用 PBS 洗涤一次，在荧光显微镜下观察并拍照。K562 细胞和 Hel 细胞每个样品收集 1×10^5~1×10^6 个细胞于 1.5 mL 离心管内，离心，弃去上清。细胞沉淀用 0.8 mL 细胞染色液重悬，加入 5 μL Hoechst 染色液，加入 5 μL PI 染色液，混匀，4 ℃孵育 25 min，PBS 洗涤一次，流式细胞仪检测。

2.2.3 统计学方法

所有数据均用 SPSS 17. 0 软件 进行统计分析，用 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较多用 F 检验。

3 化合物结构鉴定

化合物 **1** 无色油状液体，ESI-MS *m/z* 447[M + Na]$^+$，分子式 $C_{30}H_{48}O$。^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ: 5.15/5.21 (t, J = 3.6 Hz, 1H, H-12), 1.10 (s, 3H, H-23), 1.06 (s, 3H, H-24), 1.08/1.07 (s, 3H, H-25), 1.06/1.02 (s, 3H, H-26), 1.08/1.15 (s, 3H, H-27), 0.81/0.84 (s, 3H, H-28), 0.80/0.87 (s, 3H, H-29), 0.92/0.87 (s, 3H, H-30); ^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 218.02 (C-3), 145.43/139.88 (C-13), 124.36/ 121.67 (C-12), 59.30/47.62 (C-18), 55.41 (C-5), 47.59/47.47 (C-4), 47.08/47.03 (C-9), 46.94/39.85 (C-19), 42.39 (C-22), 42.01/41.66 (C-14), 40.16/39.94 (C-8), 39.75/31.25 (C-20), 39.65/39.46 (C-1), 37.27/36.84 (C-10), 34.88/31.40 (C-21), 34.38 (C-2), 33.95/32.68 (C-17), 33.49/17.64 (C-29), 32.62/32.33 (C-7), 28.94/28.58 (C-28), 28.24 (C-15), 27.09/26.75 (C-16), 26.64/ 26.29 (C-23), 26.04/23.71 (C-27), 23.85/23.81 (C-11), 23.35/21.67 (C-30), 21.55 (C-24), 19.82 (C-6), 16.99/16.89 (C-26), 15.63/15.39 (C-25)。以上数据与 Quintão et al.(2014)报道一致，故鉴定该化合物为*α*,*β*-amyrenone。

化合物 **2** 白色固体粉末，ESI-MS *m/z* 521[M + Na]$^+$，分子式 $C_{32}H_{50}O_4$。^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ: 5.28 (s, 1H, H-12), 4.51 (s, 1H, Hα-3), 2.83 (dd, J = 13.7, 3.9 Hz, 1H, Hβ-18), 2.06 (s, 3H, Me-OAc), 1.27 (s, 3H, Me), 1.14 (s, 3H, Me), 0.95 (d, J = 8.7 Hz, 6H, 2Me), 0.94 (s, 3H, Me), 0.92 (s, 3H, Me), 0.76 (s, 3H, Me); ^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 184.49 (C-28), 171.08 (C=O acetate), 143.61 (C-13), 122.54 (C-12), 80.94 (C-3), 55.29 (C-5), 47.55 (C-9), 46.56 (C-19), 45.83 (C-17), 41.53 (C-14), 40.88 (C-15), 39.27 (C-8), 38.06 (C-1), 37.69 (C-4), 36.99 (C-10), 33.79 (C-21), 33.07 (C-30), 32.51 (C-7), 32.44 (C-22), 30.67 (C-20), 28.04 (C-23), 27.66 (C-15), 25.92 (C-27), 23.59 (C-29), 23.52 (C-2), 23.39 (C-16), 22.85 (C-11), 21.32, (CH_3- acetate), 18.17 (C-6), 17.18 (C-26), 16.66 (C-24), 15.39 (C-25)。以上数据与 Carvalho & Seita(1992)报道一致，故鉴定该化合物为 3*β*-acetoxyolean-12-en-28-oic acid。

化合物 **3** 白色固体粉末，ESI-MS *m/z* 341[M + Na]$^+$，分子式 $C_{20}H_{30}O_3$。^{1}H- NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ: 5.22 (dd, *J* = 12.0, 2.3 Hz, 1H, H-20), 4.15 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, H-20), 2.23-0.83 (m, 27H, $-CH_3$); ^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 175.57 (C-19), 78.06 (C-16), 72.97 (C-20), 56.75 (C-15), 50.13 (C-5), 49.22 (C-9), 47.16 (C-13), 43.77 (C-8), 41.97 (C-10), 39.60 (C-14), 38.69 (C-7), 37.66 (C-4), 36.91 (C-3), 24.96 (C-12), 23.48 (C-17), 22.09 (C-18), 21.37 (C-6), 19.91 (C-2), 16.47 (C-11)。以上数据与 Yu et al.(1992)报道一致，故鉴定该化合物为 antriptolactone。

化合物 **4** 淡黄色固体粉末，ESI-MS *m/z* 219[M + Na]$^+$，分子式 $C_{10}H_{12}O_4$。^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD) δ: 7.53 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-6′), 7.50 (s, 1H, H-2′), 6.82 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-5′), 3.93-3.88 (m, 2H, H-3), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 3.16-3.04 (m, 2H, H-2); ^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD) δ: 198.30 (C-1), 152.07 (C-4′), 147.71 (C-3′), 129.18 (C-1′), 123.36 (C-6′), 114.43 (C-5′), 110.47 (C-2′), 57.54 (C-3), 54.98 (OCH_3), 40.26 (C-2)。以上数据与 Fu et al.(2008)报道一致，故鉴定该化合物为*ω*-hydroxypropioquaiacone。

化合物 **5** 黄色固体粉末，ESI-MS *m/z* 177[M－H]$^-$，分子式 $C_{10}H_{10}C_3$。^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ: 9.54 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H, H-3), 7.37-7.31 (m, 1H, H-2′), 7.04 (dd, *J* = 8.2, 1.9 Hz, 1H, H-6′), 7.00 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H-5′), 6.88 (dd, *J* = 11.6, 7.4 Hz, 1H, H-1), 6.52 (dd, *J* = 15.8, 7.8 Hz, 1H, H-2), 3.87 (d, *J* = 4.2 Hz, 3H, OCH_3); ^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 194.10 (C-3), 153.75 (C-3′), 149.35 (C-4′), 147.27 (C-1′), 126.43 (C-2), 126.08 (C-1), 124.15 (C-6′), 115.18 (C-5′), 109.77 (C-2′), 55.97 (OCH_3)。以上数据与 Wang et al.(2012)报道一致，故鉴定该化合物为 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-propenal。

化合物 **6** 白色固体粉末，ESI-MS *m/z* 167[M－H]$^-$，分子式 $C_9H_{12}O_3$。^{1}H-NMR (600 M Hz, CD_3OD) δ: 6.72 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H-2), 6.63 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-6), 6.57 (dd, *J* = 8.0, 1.8 Hz, 1H, H-5), 3.75 (s, 3H, OCH_3), 3.63 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-2′), 2.65 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H -1′); ^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD) δ: 147.44 (C-3), 144.48 (C-4), 130.44 (C-1), 121.01 (C-6), 114.72 (C-5), 112.29 (C-2), 63.15 (C-2′), 54.96 (OCH_3), 38.44 (C-1′)。以上数据与 Liu & Luo(2012)报道一致，故鉴定该化合物为 3-methoxy-4-hydroxy phenylethanol。

化合物 **7** 白色无定性粉末，ESI-MS *m/z* 151[M－H]$^-$，分子式 $C_8H_8O_3$。^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD) δ: 9.68 (s, 1H, CHO), 7.37 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H, H-2, 6), 6.89 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-5), 3.86 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD) δ: 191.43 (C-7), 153.38 (C-4), 148.25 (C-3), 128.94 (C-1), 126.66 (C-6), 115.17 (C-5), 109.73 (C-2), 54.99 (C-8)。以上数据与 Kwon et al.(2001)报道一致，故鉴定该化合物为 vanillin。

化合物 **8** 白色无定性粉末，ESI-MS *m/z* 185 [M + H]$^+$，分子式 $C_9H_{12}O_4$。^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD) δ: 6.01 (s, 2H, H-2, 6), 3.68 (s, 6H, 3, 5-OCH_3), 3.58 (s, 3H, 4-OCH_3); ^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD) δ: 154.04 (C-3, 5), 153.56 (C-1), 130.74 (C-4), 92.54 (C-2, 6), 59.92 (4-OCH_3), 54.98 (3, 5-OCH3)。以上数据与柳庆龙等(2017)报道一致，故鉴定该化合物为 3, 4, 5-三甲氧基苯酚。

化合物 **9** 白色固体粉末，ESI-MS *m/z* 137[M－H]$^-$，分子式 $C_7H_6O_3$。^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD) δ: 7.76 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2, 6), 6.74 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3, 5); ^{13}C-NMR

(150 MHz, CD_3OD) δ: 168.86 (COOH), 161.88 (C-4), 131.66 (C-2, 6), 121.34 (C-1), 114.71 (C-3, 5)。以上数据与王洪平等（2013)报道一致，故鉴定该化合物为对羟基苯甲酸。

化合物 **10** 淡黄色固体粉末，ESI-MS *m/z* 123[M + H]$^+$，分子式 $C_7H_6O_2$。^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD) δ: 9.66 (s, 1H, CHO), 7.67 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-2, 6), 6.82 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H-3, 5); ^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD) δ: 191.52 (CHO), 163.79 (C-4), 132.11 (C-2, 6), 128.87 (C-1), 115.53 (C-3, 5)。以上数据与钱群刚等（2019)报道一致，故鉴定该化合物为对羟基苯甲醛。

化合物 **11** 淡黄色固体粉末，ESI-MS *m/z* 153[M − H]$^-$，分子式 $C_8H_{10}O_3$。^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD) δ: 6.97 (s, 1H, H-5), 6.78 (s, 2H, H-3, 6), 4.53 (s, 2H, H-1′), 3.85 (s, 3H OCH_3); ^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD) δ: 147.56 (C-3), 145.54 (C-5), 132.84 (C-1), 119.71 (C-4), 114.59 (C-2), 110.73 (C-6), 63.93 (C-7), 54.95 (OCH_3)。以上数据与 Challice et al.(1980)报道一致，故鉴定该化合物为 vanillyl alcohol。

化合物 **12** 黄色固体粉末，ESI-MS *m/z* 191[M + Na]$^+$，分子式 $C_8H_8O_4$。^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ: 5.88 (s, 2H, H-3, 5), 3.84 (s, 6H, OCH_3×2); ^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 176.70 (C-1), 186.48 (C-4), 157.33 (C-2, 6), 107.43 (C-3, 5), 56.50 (OCH_3×2)。以上数据与 Kwon et al.(2001)报道一致，故鉴定该化合物为 2, 6-dimethxy-1, 4-benzoquinone。

4 生物活性测试结果

4.1 MTT 法筛选化合物活性

本实验首先对分离得到的化合物进行抗肿瘤活性筛选。采用 SH-SY5Y 细胞株、K562 细胞株、Hel 细胞株检测化合物的抗肿瘤作用；结果表明给药浓度为 50 μmol·L^{-1} 时化合物 **12** 对 K562 细胞株和 Hel 细胞株具有很强的抑制作用，对 SH-SY5Y 细胞株具有较强的抑制作用（见表 1）。鉴于化合物 **12** 给药浓度 50 μmol·L^{-1} 时，SH-SY5Y 细胞株、K562 细胞株、Hel 细胞株均具有很强的抑制作用，所以对其 IC_{50} 值进行了测定（阳性药：甲氨蝶呤水合物，给药浓度：1 mg·L^{-1}），结果显示化合物 **12** 对 SH-SY5Y 细胞株、K562 细胞株、Hel 细胞株均有较强的抑制率，IC_{50} 分别为（35.6±2.8）、（28.8±0.5）、14.3±0.9（μmol·L^{-1}）。

表 1. 化合物 **1-12** 在不同给药浓度下对各种肿瘤细胞系的抑制率

Table 1. Inhibition rates(%) of compounds **1-12** against various cancer cell lines at different dosing concentrations

编号 No.	给药浓度 Dosing concentration(μmol·L^{-1})					
	K562		Hel		SH-SY5Y	
	50	100	50	100	50	100
1	17.18±6.5	30.34±5.3	8.50±3.1	15.74±7.2	—	9.17± 7.1
2	—	—	47.73±2.5	58.47±4.1	—	18.09±1.1

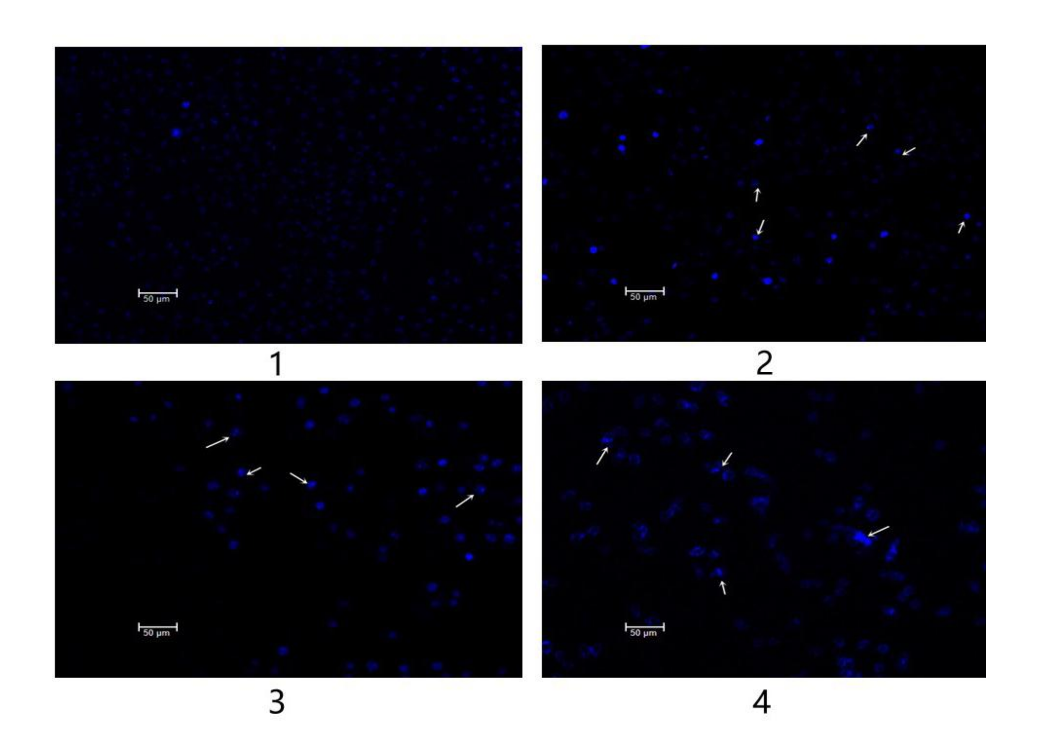
3	12.84±7.7	19.16±14.8	36.47±1.8	61.41±2.1	16.27±9.0	39.05±4.0
4	—	12.26±7.7	—	15.97±4.6	—	—
5	19.47±5.8	29.26±3.1	32.51±4.7	41.74±6.1	—	13.45±0.8
6	—	—	7.78±9.7	14.13±1.6	--	—
7	—	—	—	18.48±2.2	—	13.78±3.5
8	—	—	23.00±1.4	20.67±3.9	—	10.86±9.9
9	10.91±10.2	18.64±8.6	—	14.60±3.4	—	—
10	—	—	12.45±3.4	17.45±7.3	—	—
11	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ
12	91.76±0.1	Δ	94.39±0.1	Δ	67.84±1.6	Δ

注：—没活性；Δ.未检测。

Note: — Inactive; Δ. Not detected

4.2 Hoechst 染色

为了进一步检测化合物 **12** 的促凋亡作用，我们分别对不同浓度化合物 **12** 作用的细胞用细胞凋亡荧光 Hoechst33344/PI 双染试剂盒进行了染色处理，SH-SY5Y 细胞株为贴壁细胞，故染色后用荧光显微镜拍摄染色剂对细胞核的染色情况。结果显示：与空白组相比给药组细胞皱缩变圆，核膜破裂，核质流出，且具有明显的剂量依赖性（图 2）。由于 K562 细胞株和 Hel 细胞株为半贴壁细胞，其染色后难以用荧光显微镜拍出清晰的图片，故采用流式细胞仪检测其凋亡情况。从结果可以看出，与空白组相比，随着化合物浓度的增加，两种细胞凋亡比例也随之增加（见图 3、图 4），表明化合物可以促进两种细胞的凋亡，且该作用和浓度呈剂量依赖关系。

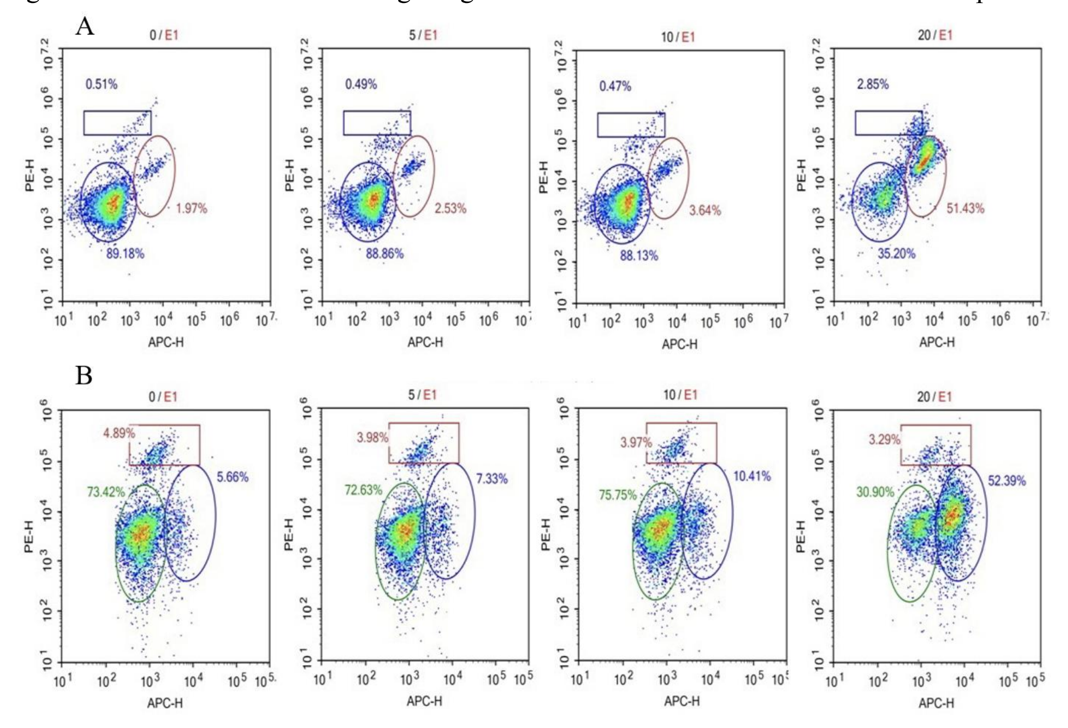


图中 **1** 为空白组，**2**，**3**，**4** 的给药浓度分别为 10、20、50 μmol·L-1

1 in the figure is the blank group, and the administration concentrations of **2**, **3**, and **4** are 10 μmol·L-1, 20 μmol·L-1, and 50 μmol·L-1, respectively

图 2 SH-SY5Y 细胞在化合物 **12** 作用下 Hoechst 荧光染色图

Fig. 2 Hoechst fluorescence staining image of SH-SY5Y cells under the action of Compound **12**



图中 A 为 Hel 细胞在化合物 12 作用下的流式检测图，B 为 K562 细胞在化合物 12 作用下的流式检测图，0、5、10、20 分别代表药浓度为 0、5、10、20 μmol·L-1，其中 E1 为进样细胞中的活细胞，PE 和 APC 分别代表藻红蛋白与别藻蓝蛋白

In the figure, A is the flow cytometry diagram of Hel cells under the action of compound 12, and B is the flow cytometry diagram of K562 cells under the action of compound 12. C is a histogram of apoptosis of two kinds of cells with different concentrations of drugs. 0, 5, 10, and 20 respectively represent the drug concentration of 0, 5, 10, 20 μmol·L-1, where E1 is the live cell in the injection cell, PE and APC represent phycoerythrin and Allophycocyanin.

图 3 Hel 细胞和 K562 细胞在化合物 **12** 作用下流式检测图

Fig. 3 Flow cytometric image of Hel cells and K562 cells under the action of Compound **12**

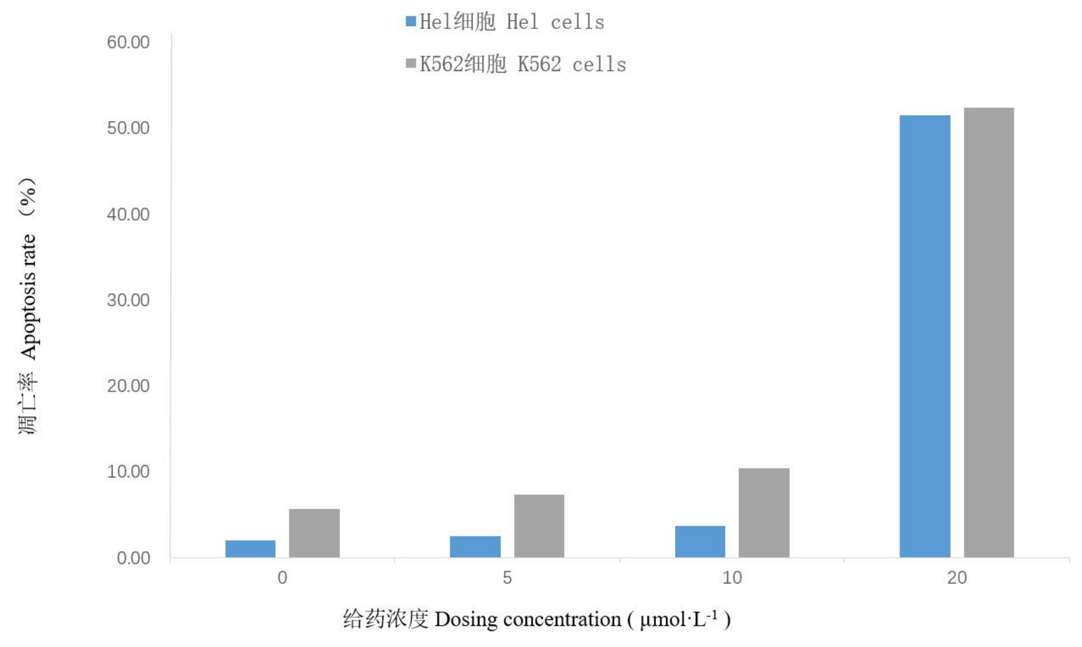


图 4 不同浓度药物对两种细胞的凋亡柱状图

Fig. 4 Histogram of apoptosis of two kinds of cells with different concentrations of drugs

5 结论与讨论

本研究从雷公藤醇提物中共分离鉴定了醌类化合物 1 个，萜类化合物 3 个以及酚酸类化合物 8 个，并对这些化合物进行了抗肿瘤活性筛选。发现化合物 **2**，**3**，**5** 和 **12** 对不同肿瘤细胞均呈现出一定的抑制活性，其中醌类化合物 **12** 的抗肿瘤活性最为显著，对 SH-SY5Y 细胞株、Hel 细胞株、K562 细胞株的 IC_{50} 值分别为 35.6 μmol·L^{-1}、14.3 μmol·L^{-1}、28.8 μmol·L^{-1}(文献值 IC_{50}=25.5 μmol·L^{-1})(刘睿等, 2005)。这也是化合物 **12** 首次报道对 SH-SY5Y 细胞株和 Hel 细胞株的增殖影响，其作用机制还有待进一步确认。

雷公藤的生物活性研究主要集中于二萜，三萜和生物碱，但大量研究表明，这些活性物质均有一定的毒性，其中二萜类成分毒性最大，例如雷公藤甲素对人乳腺癌，结肠癌，卵巢癌均有明显的抑制作用，特别是对卵巢癌，平均半数生长(G150)显著低于紫杉醇（Guan et al., 1989），但其对肝细胞具有明显的损伤作用且具有一定的剂量依赖性（Zhang et al., 2016）；雷公藤红素的抑瘤率为 65%~93%，超过了紫杉醇（翟边，2016），而雷公藤红素对于心血管系统也有着潜在的危害。这一原因大大限制了雷公藤在临床上的推广与应用。本次实验发现的醌类化合物 **12** 具有较强的抗肿瘤活性，而关于该植物中醌类化合物的生物活性尚未见报道。这一研究表明了雷公藤中的醌类化合物在抗神经母瘤细胞方面具有很大的潜力，也为后续雷公藤中其他活性成分的开发提供了实验基础。

参考文献：

CARVALHO LM, SEITA J, 1993. A new oleanolic acid derivative from *Securinega tinctoria*[J]. Planta Med, 59: 369-372.

CHALLICE JS, LOEFFLER RST, WILLIAMS AH, 1980. Structure of calleryanin and its benzylic esters from *Pyrus* and *Prunus*[J]. Phytochemistry, 19: 2435-2437.

CHANG ZL, QIN WB, ZHENG HL, et al.，2021. Triptonide is a reversible non-hormonal male contraceptive agent in mice and non-human primates[J]. Nat Commun, 12(1): 1-14.

CHOU T, MEI P, 1936. Study on Chinese herb Lei Gong Teng, *Tripterygium wilfordii* Hook f. I: The coloring substance and the sugars[J]. Chin J Physiol, 10, 529-534.

FU ZH, ZHANG YM, TAN NH, et al.，2008. Chemical constituents of *Keteleeria evelyniana*[J]. Nat Prod Res Dev, 20: 257-261.

KWON HC, CHOI SU, LEE KR, 2001. Phytochemical constituents of *Artemisia stolonifera*[J]. Arch Pharm Res, 24: 312-315.

LIU SY, LUO DQ, 2010. Study on the chemical constituents of *Trollius chinensis*[J]. Chin Herb Med, 041(003): 370-373. [刘召阳，罗都强，2010. 金莲花的化学成分研究[J]. 中草药，041 (003)：370-373.]

LIU J, LEE J, HERNANDEZ M, et al.，2015. Treatment of obesity with celastrol[J]. Cell, 161(5): 999-1011.

LI JY, 2017. Study on the chemical constituents of *Tripterygium wilfordii* root[J]. Strait Pharm J, 29(11): 21-23. [利剑余，2017. 雷公藤根的化学成分研究[J]. 海峡药学，29(11)：21-23.]

LIU QL, CHEN AH, TANG JY, et al.，2017. Chemical constituents from stems and leaves of *N-auclea officinalis*[J]. Chin Herb Med, 48(1): 52-57. [柳庆龙，陈阿虹，唐进英，等，2017. 胆木枝叶的化学成分研究[J]. 中草药，48(1)：52-57.]

LIU R, GU QQ, CUI CB, et al.，2005. Chemical constituents of *Schefflera venulosa* and their anti tumor activities[J]. Chin Herb Med, 36(3): 328-332. [刘 睿，顾谦群，崔承彬，等，2005. 密脉鹅掌柴的化学成分及其抗肿瘤活性[J]. 中草药，36(3)：328-332.]

LIU WP, LIU SX, TANG HZ, et al.，2010. New progress in the study of *Tripterygium wilfordii* [J]. Chin Herb Med, 41(7): 1215-1218. [刘为萍，刘素香，唐慧珠，等，2010. 雷公藤研究新进展[J]. 中草药, 41(7)：1215-1218.]

MA Z, LIANG MX, ZHANG Y, et al.，2011. Research progress on chemical constituents and p-harmacological effects of *Tripterygium wilfordii*[J]. Asia-Pacific Trad Med, 7 (3): 157-160. [马哲，梁茂新，张颖，等，2011. 中药雷公藤化学成分及药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药，7 (3)：157-160.]

MA WG, ZHANG T, ZHANG C, et al.，2006. Research and prospect of the toxic drug *Tripterygium wilfordii*[J]. Chin J Tradit Chinese Med Pharm. [马伟光，张滔，张超，等，2006. 有毒药物雷公藤的研究及展望[J]. 中华中医药杂志，21(2)：117-120.]

QUINTAO NLM, ROCHA LW, SILVA GF, et al.，2014. Contribution of *α,β*-Amyrenone to the anti-inflammatory and antihypersensitivity effects of *Aleurites moluccana* (L.) Willd.[J]. Biomed Res Int, 2014(2): 636839.

QIAN QG, CAI L, YANG SH, et al.，2019. Chemical constituents from *Carpesium abrotanoides* [J]. Chin Tradit Pat Med, 41(11): 2671-2673. [钱群刚，蔡亮，杨胜辉，等，2019. 天名精化学成分的研究[J]. 中成药，41(11)：2671-2675.]

WANG LQ, WU MM, HUANG J, et al.，2012. Chemical constituents of *Eria spicata*[J]. Chem Nat Compd, 48: 168-169.

WANG HP, CHAO F, YANG XW, 2013. Study on chemical constituents of the aereal parts of *P-olygonum capitatum*[J]. Chin Herb Med, 44(1): 24-30. [王洪平，曹芳，杨秀伟，2013. 头花蓼地上部分的化学成分研究[J]. 中草药，44(1)：24-30.]

YU DD, XIE FZ, LIANG XT, 1992. A new diterpene lactone from *Tripterygium wilfordii*[J]. Chin Chem Lett, 3: 435-436.

ZHAI B, 2006. Wuhan scientists discovered for the first time that *Tripterygium wilfordii* is expected to become a new anti-cancer drug[J]. Chin J Chin Mater Med, 22(9): 15. [翟边，2006. 武汉科学家首次发现雷公藤有望成为抗癌新药[J]. 中国制药信息，22(9)：15]

ZHANG L, WANF T, LI Q, et al.，2016. Fabrication of novel vesicles of triptolide for antirheumatoid activity with reduced toxicity *in vitro* and *in vivo* [J]. Int J Nanomed, 11: 2663-2673.

ZHENG JX, WANG NL, CHEN HF, et al.，2007. Isolation and identification of phenolic constituents from *Selaginella uncinata*(Desv.) Spring[J]. Chin J Med Chem, 17: 302-305.